



TITLE:

がん分子イメージングの画像コントラスト向上を目的としたペプチドPETプローブの動態制御に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

松村, 一史

CITATION:

松村, 一史. がん分子イメージングの画像コントラスト向上を目的としたペプチドPETプローブの動態制御に関する研究. 京都大学, 2016, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19666>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2017-03-22に公開; 許諾条件により本文は2018-08-01に公開→2021-03-31公開に変更

京都大学	博士（薬科学）	氏名	松 村 一 史
論文題目	がん分子イメージングの画像コントラスト向上を目的としたペプチドPETプローブ動態制御に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>ポジトロンエミッショントモグラフィ(PET)は、生体を対象としたイメージングで力を発揮し、創薬や臨床の場で標準的に活用されつつあるモダリティである。医薬品化合物のポジトロン標識体を用いたPET研究は、これまでin vitro試験や動物における動態データから外挿するしかなかった組織中薬物濃度をヒトで直接評価することを可能にした。さらに、薬物動態と薬効の関連を強く結びつけてがん分子標的薬などの開発や投薬を効果的に進めるためには、薬効を反映したサロゲートエンドポイントとしてイメージングバイオマーカーの有用性も高い。臨床ではがんイメージング用PETトレーサーとして2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose([¹⁸F]FDG)や3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine([¹⁸F]FLT)などが使用されているが、これらの集積は代謝や細胞増殖活性を反映したものであり、がんの質的变化を的確に把握するには、がん関連分子の発現変化や生理活性を反映した多彩な分子標的に対するPETプローブの開発が急務とされている。</p> <p>コントラストの良いがんイメージングを実現するPETプローブは、がん組織選択的な高集積と、速やかな血中からの消失という相反する動態特性を持つ必要がある。すなわちPETプローブ開発は、ポジトロン標識した親和性リガンドの動態制御に関する課題と捉えられる。ヒット化合物の探索や合成展開に時間を要する低分子リガンドに比べ、進化工学的手法で合理的に取得可能なペプチドリガンドについて、申請者はそのポジトロン標識体すなわちPETプローブの画像コントラスト向上を目的とした動態制御研究を行った。まず、がん組織選択的な集積性の向上に向けて、ペプチドの動態改善に広く利用されているポリエチレングリコール(PEG)を骨格とする樹状高分子修飾による動態変化の要因を、多価効果、血中循環期間、細胞内滞留性などの観点から検証した。次に、PEG修飾ペプチドPETプローブ内に導入したジスルフィド架橋の生理的条件下での時限的開裂や、外因性の酵素の静脈内投与によるスイッチング型の切断・分解を利用し、特に腎排泄制御に基づく血中からの消失促進を試みた。これらの結果から、化学修飾によるペプチドPETプローブの、細胞から全身レベルに至る動態制御とがん分子イメージングの画像コントラストの関連について検証した。</p>			
<p>第1章 樹状 PEG 修飾 ⁶⁴Cu ボンベシンアナログの多量体の価数および分子量が腫瘍集積・貯留性に及ぼす影響と PET 画像コントラスト</p> <p>申請者は、glucose-regulated protein 78を標的としたsiRNA(GRP78 siRNA)を用いた核酸治療法に関する検証を行い、GRP78 siRNAをリポソーム製剤化してがん細胞内へ高効率に送達することでunfolded protein response誘導性アポトーシスを活性化させ、がん細胞の増殖を抑制することに成功した。併せて、このような分子標的薬の開発において、投薬後のがんの量的・質的な変化の把握に適した分子標的に対するPETプローブ開発の重要性が示唆された。</p> <p>そこで、ペプチドPETプローブの樹状PEG修飾による動態制御がPET画像に及ぼす影響について、ボンベシンアナログ(gastrin-releasing peptide receptor(GRPR)親和性ペプチド;BBN)の⁶⁴Cu標識体を用いて検証した。多量体の価数(1(直鎖)/4(8価))と分子量(10/40kDa)を変数とした一連の樹状PEG修飾⁶⁴Cu標識体を作製し、PC-3細胞(GRPR高発現株)による取り込みを比較したところ、直鎖PEG修飾体はステルス効果の影響と思われる低い取り込みを示した。一方、樹状PEG修飾体では取り込み量が約3倍上昇し、多量体化によるプローブと標的細胞との親和性向上が示唆された。また、各種PEG修飾体ではPC-3担がんモデルマウス投与後の血中循環が延長し、腫瘍組織集積量が顕著に増加した。Tumor/muscleを指標としてコントラストを評価すると、10kDaの4armPEG修飾体(⁶⁴Cu-4arm PEG-BBN₄)が最高値を示し、さらに、PET画像をTAC解析した結果、PEG未修飾体</p>			

(^{64}Cu -BBN)は腫瘍組織内放射活性が経時的に減少するが、 ^{64}Cu -4arm PEG-BBN₄では2日間に渡って維持されることが明らかとなった。 ^{64}Cu -4arm PEG-BBN₄の血中放射活性は経時的に減少するので、この違いを高分子量PEG修飾による血中循環の延長のみから説明することは困難であり、そこでPC-3細胞と ^{64}Cu -4arm PEG-BBN₄の相互作用を検討したところ、 ^{64}Cu -BBNと同様にエンドサイトーシス機構により取り込まれ、また、24時間後には ^{64}Cu -BBNでは取り込まれた放射活性の内約50%が漏出したのに対し、 ^{64}Cu -4arm PEG-BBN₄では漏出は15%程度であることが明らかとなった。以上の結果より、樹状PEG修飾 ^{64}Cu ボンベシンアナログは、多価効果や血中循環の延長に加え、エンドソーム/リソソーム内での代謝安定化、あるいは高分子量化による細胞からの漏出抑制により、腫瘍組織内貯留性が向上しているものと考察された。

第2章 樹状PEG修飾 ^{64}Cu ボンベシンアナログテトラマーに導入したジスルフィド架橋の生体内での開裂とPET画像コントラスト向上への寄与

高コントラストながんPET分子イメージングを実現するには、腫瘍組織集積・貯留性に加え、クリアランスを考慮した分子プローブ設計が必要である。本章では、前章で高い腫瘍組織集積が認められた樹状PEG修飾 ^{64}Cu ボンベシンアナログテトラマーに対し、生理的条件下で時限的に開裂するジスルフィド架橋を導入したPETプローブ(^{64}Cu]BBN-SS)₄-PEGを作製し、その腫瘍組織集積性と血中クリアランスの変化を評価した。PET画像から、(^{64}Cu]BBN-SS)₄-PEG投与群では非開裂体を投与した対照群と比べて速やかな排泄が認められ、バックグラウンド低下により短時間(約90分)で腫瘍が観察でき、また48時間後のtumor/blood(T/B)は約5倍高かった。一方、(^{64}Cu]BBN-SS)₄-PEGの腫瘍組織集積量は非開裂体と比較して有意に低下していた。このように、ジスルフィド結合の生体内での開裂は期待通りPETプローブの全身からの消失の促進によりPET画像コントラストの向上をもたらしたが、併せて腫瘍組織集積性の低下を招いたことから、腫瘍組織集積性を維持した排泄促進を可能にするプローブ設計が必要であることが示唆された。

第3章 外因性ウロキナーゼ静脈内投与による樹状PEG修飾 ^{64}Cu ボンベシンアナログテトラマーのスイッチング型腎排泄を意図したPETプローブの設計と評価

本章では、一定期間安定に血中循環して腫瘍組織選択的に集積した後、特定の刺激で分解されるPETプローブとして、既に臨床で用いられているウロキナーゼ(uPA)と、その酵素認識配列を樹状PEG修飾 ^{64}Cu ボンベシンアナログテトラマーに組み合わせたシステムを設計した。すなわち、前章のジスルフィドの代わりにuPA認識配列で架橋したPETプローブ(^{64}Cu]BBN-uPA)₄-PEGを投与して腫瘍に集積させ、一定時間後にuPAを投与してプローブを分解することで尿中排泄を促す戦略となる。まず、この酵素認識配列はマウス血液中で48時間代謝的に安定で、uPA添加後1時間で完全に切断されることを確認した。次に、(^{64}Cu]BBN-uPA)₄-PEGを用いたPET試験において、uPAの引き続く静脈内投与により腎排泄が促進され、血中放射活性量が速やかに低下することが示された。この際、腫瘍組織内放射活性は、期待通りuPA投与/非投与に関わらず同じレベルで維持されており、uPA投与群では非投与群と比較してT/Bが約3倍高かった。以上の結果から、uPAとその酵素認識配列を活用したスイッチング型の腎排泄促進により腫瘍組織集積性を低下させることなく画像コントラストを向上させることに成功した。

以上申請者は、ペプチドPETプローブについて、樹状PEG修飾による腫瘍組織集積性の向上と外因性ウロキナーゼ静脈内投与によるスイッチング型腎排泄に基づいたバックグラウンドの低下を実現した。本知見は、ペプチドPETプローブの動態制御に対し有用な設計指針を与えるものである。

(論文審査の結果の要旨)

医薬品化合物のポジトロン標識体を用いたポジトロンエミッショントモグラフィー(PET)は、これまでin vitro試験や動物における動態データから外挿するしかなかった組織中薬物濃度をヒトで直接評価することを可能にした。また、薬物動態と薬効の関連を結びつけて医薬品開発や薬物投与を効率的に進めるうえでも、薬効を反映したサロゲートエンドポイントとしてのイメージングバイオマーカーの有用性は高い。臨床ではがんイメージング用PETトレーサーとして、2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucoseなどが使用されているが、これらのがんへの集積は代謝や細胞増殖活性を反映したものであり、がんの質的変化を的確に把握するためにはがん関連分子の発現変化や生理活性を反映する多様な分子標的に対するPETプローブの開発が急務とされている。また、コントラストの良いがんイメージングを得るためには、PETプローブはがん組織選択的な集積と速やかな血中からの消失という、相反する動態特性を持つ必要があり、PETプローブ開発はポジトロン標識を行った親和性リガンドの動態制御に関する課題とも理解される。著者は、ペプチドリガンドのポジトロン標識体の画像コントラスト向上を目的としてその動態制御に関する研究を行った。

まず、ペプチドPETプローブの樹状PEG修飾がPET画像に及ぼす影響について、ボンベシンアナログ(gastrin-releasing peptide receptor(GRPR)親和性ペプチド; BBN)の⁶⁴Cu標識体を用いて検討した。多量体の価数(1(直鎖)/4/8価)と分子量(10/40kDa)を変えた一連の樹状PEG修飾⁶⁴Cu標識体を作製し、GRPRを高発現するPC-3細胞による取り込みを比較したところ、直鎖PEG修飾体は低い取り込みを示したのに対し、樹状PEG修飾体では取り込み量が約3倍上昇し、多量体化によるプローブと標的細胞との親和性向上が示唆された。また、各種PEG修飾体ではPC-3担がんモデルマウスに投与後の血中滞留が延長し、腫瘍組織集積量が顕著に増加した。腫瘍/筋肉比(T/B)を指標としてコントラストを評価すると、10kDaの4armPEG修飾体(⁶⁴Cu-4arm PEG-BBN₄)が最高値を示し、さらに、PET画像をTAC解析した結果、PEG未修飾体(⁶⁴Cu-BBN)は腫瘍組織内放射活性が経時的に減少するが、⁶⁴Cu-4arm PEG-BBN₄では2日間にわたって維持されることが明らかとなった。PC-3細胞において、⁶⁴Cu-4arm PEG-BBN₄が⁶⁴Cu-BBNと同様にエンドサイトーシス機構により取り込まれ、また24時間後でも細胞からの漏出が15%程度であったことから、樹状PEG修飾⁶⁴Cuボンベシンアナログは、多価効果による親和性増大や血中循環の延長に加え、エンドソーム/リソソーム内での代謝安定化あるいは高分子量化による細胞からの漏出抑制により、腫瘍組織内貯留性が向上しているものと考察された。

次に、腫瘍組織集積と貯留性に加え高コントラストながんPET分子イメージングの実現に必要な血液循環からの消失を考慮して、高い腫瘍組織集積が認められた樹

状PEG修飾⁶⁴Cuボンベシンアナログテトラマーに対し、生理的条件下で時限的に開裂するジスルフィド架橋を導入したPETプローブ([⁶⁴Cu]BBN-SS)₄-PEGを作製し、その腫瘍組織集積性と血中消失速度の変化を評価した。PET画像から、([⁶⁴Cu]BBN-SS)₄-PEG投与群では非開裂体を投与した対照群と比べて速やかな排泄が認められ、バックグラウンド低下により短時間で腫瘍が観察できるようになったが、一方腫瘍組織集積量は非開裂体と比較して有意に低下していた。そこで著者は、一定期間安定に血中を循環して腫瘍組織選択的に集積した後特定の刺激で分解されるPETプローブとして、ウロキナーゼ(uPA)とその酵素認識配列を樹状PEG修飾⁶⁴Cuボンベシンアナログテトラマーに組み合わせたシステムを設計した。本酵素認識配列がマウス血液中で48時間代謝的に安定でuPA添加後1時間で完全に切断されることを確認後、PET試験においてuPAの静脈内投与により([⁶⁴Cu]BBN-uPA)₄-PEGの腎排泄が促進され血中放射活性量が速やかに低下することを確認した。この際、腫瘍組織内放射活性は期待通りuPAの投与に関わらず同じレベルで維持されており、uPA投与群では非投与群と比較してT/Bが約3倍高かった。以上の結果より、uPAとその酵素認識配列を利用したスイッチング型の腎排泄促進により、腫瘍組織集積性を低下させることなく画像コントラストを向上させることに成功した。

以上、著者はペプチドPETプローブに対して樹状PEG修飾による腫瘍組織集積性の向上と外因性ウロキナーゼ静脈内投与によるスイッチング型腎排泄に基づいたバックグラウンドの低下を実現した。本知見は、ペプチドPETプローブの動態制御に対し有用な設計指針を与えるものと評価される。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月26日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降